

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

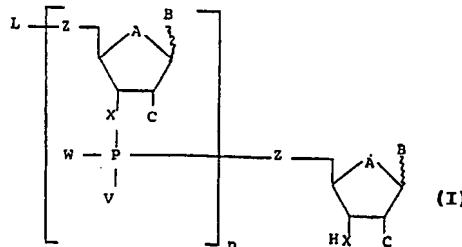
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/15499 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Oktober 1991 (17.10.91)
C07H 19/04, A61K 31/70 C07H 21/00, C12Q 1/68		
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00665		(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Möhlstraße 22, D-8000 München 80 (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. April 1991 (08.04.91)		
(30) Prioritätsdaten: P 40 11 473.2 9. April 1990 (09.04.90) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): EURO- PÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR- BIOLOGIE [DE/DE]; Meyerhofstraße 1, D-6900 Hei- delberg (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>) : SPROAT, Brian [GB/ DE]; Röntgenstraße 38, D-6900 Heidelberg (DE). LA- MOND, Angus [GB/DE]; Schillerstraße 36, D-6901 Wiesbach (DE).		Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: 2'-O-ALKYL NUCLEOTIDES AND POLYMERS CONTAINING THEM**(54) Bezeichnung:** 2'-O-ALKYNUKLEOTIDE SOWIE POLYMERE, DIE SOLCHE NUKLEOTIDE ENTHALTEN**(57) Abstract**

Oligonucleotides of the general formula (I), in which: B is any nucleo base; A is O or CH₂; X or Z are O, S, NH or CH₂, where X and Z may be the same or different; V and W are an O, S, Se, NH₂ or an alkyloxy radical, OH or SH, where V and W may be the same or different in a monomer unit; and L is an H atom or a partner of a bonding pair and C is -O-R and R is a possibly modified alkyl group with at least one C atom or a possibly modified alkenyl or alkinyl group with at least 2 C atoms, whereby the modification consists in a substitution by one or more halogen, cyano, carboxy, hydroxy, nitro and/or mercapto radicals; n is any whole number; are stable and specifically binding anti-sense probes. Such oligo and polynucleotides are useful for controlling gene expression and as medicaments. They are synthesised from the corresponding 2'-substituted monomers by prior art processes, preferably on a solid phase.

**(57) Zusammenfassung**

Oligonukleotide der allgemeinen Formel (II), in der B eine beliebige Nukleobase bedeutet, A gleich O oder CH₂ ist, X oder Z gleich O, S, NH oder CH₂ bedeutet, wobei X und Z gleich oder verschieden sein können, V und W ein O, S, Se, NH₂ oder ein Alkyloxyrest, OH oder SH bedeutet, wobei V und W in einer Monomereinheit gleich oder verschieden sein können und L ein H-Atom oder ein Partner eines Bindepaares ist und C gleich -O-R ist und R eine gegebenenfalls modifizierte Alkylgruppe mit mindestens 1 C-Atom, oder eine gegebenenfalls modifizierte Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit mindestens 2 C-Atomen bedeutet, wobei die Modifikation in einer Substitution durch einen oder mehrere Halogen-, Cyano-, Carboxy-, Hydroxy-, Nitro- oder/und Mercapto-Reste besteht, n eine beliebige ganze Zahl ist, sind stabile und spezifisch bindende Anti-Sense-Proben. Solche Oligo- und Polynukleotide finden zur Steuerung der Genexpression und als Arzneimittel Verwendung. Ihre Synthese erfolgt aus den entsprechenden 2'-substituierten Monomeren nach an sich bekannten Verfahren, vorzugsweise an einer festen Phase.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BC	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

- 1 -

2'-O-Alkylnukleotide sowie Polymere, die solche Nukleotide enthalten

B E S C H R E I B U N G

Die Erfindung betrifft neue Nukleotidmonomere sowie Oligo- und Polynukleotide, die solche Monomere enthalten, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Steuerung der Genexpression, als Anti-Sense-Proben und als Arzneimittel.

Anti-Sense-Oligo- und Polynukleotide sind dem Fachmann bekannt und zusammenfassend z.B. in Spektrum der Wissenschaft (1990), Seiten 70 bis 77 beschrieben. Darunter werden die zum eigentlichen Gen komplementären Nukleotide mit gegenläufiger Sequenz verstanden. Solche Anti-Sense-Moleküle greifen regulierend in die Genexpression ein und spielen dabei eine wesentliche Rolle, ob eine in einem Gen kodierte Erbsequenz in ein Protein übersetzt wird. Die Trennung der beiden DNA-Stränge wird dabei durch eine kurze RNA-Kette, dem sogenannten Primer ausgelöst, der zuerst die DNA-Doppelhelix öffnet und der mit dem Replikationsursprung hybridisiert. Es hat sich gezeigt, daß nun die Genexpression nicht nur von der Konzentration dieser Primermoleküle abhängt, sondern von deren Verhältnis zur Anti-Sense-RNA. Auf diese Weise ist es daher möglich, in einer Zelle gezielt vorausbestimmte Gene an- und auszuschalten und so die gesamte Zellfunktion zu steuern. So ist es z.B. bereits gelungen, mittels einem Polyoma-Virus maligne transformierte Zellen dadurch wieder gesund erscheinen zu lassen, daß man in diese polyoma-transformierte Zellen Expressionsvektoren für eine Anti-Sense-RNA gegen src einschleust. Dadurch verlieren diese Zellen ihre krebsartigen Merkmale. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dieser Anti-Sense-Technik bereits an den Onkogenen fos, ras und sys erzielt. Schließlich ist es auch bereits in Gewebekulturen gelungen, mit Anti-Sense-Oligonukleotiden die Infektion von Herpes-Viren, Influenza-Viren und dem HIV-Virus zu hemmen. Mit Hilfe von biotinylierten Anti-Sense-Oligonukleotiden ist

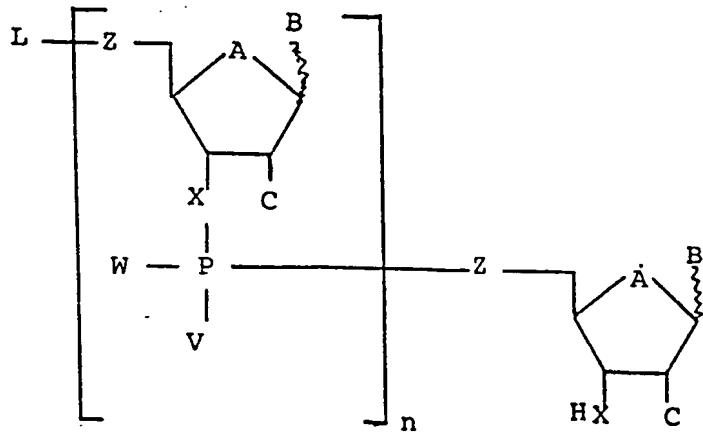
es auch bereits gelungen, die Ausbildung und Wirkung des Splicing-Komplexes näher zu untersuchen (S. Barabino, B. Sproat et al., The EMBO Journal 8, 4171-4178 (1989)).

Die bislang bekannten Anti-Sense-Oligo- und Polynukleotide weisen jedoch den Nachteil auf, daß diese nach dem Einschleusen in eine intakte Zelle von RNA und DNA spezifischen Nukleasen angegriffen und abgebaut werden, wodurch ihre Wirkung verlorengeht. Es ist daher bereits versucht worden, den Abbau von Poly- und Oligoribonukleotiden durch Nukleasen mittels 2'-O-Methylsubstitution zu hemmen (B. Sproat et al., Nucleic Acids Research 17 (1989), 3373-3386).

Die Erfindung hat daher zum Ziel, neue Oligo- und Polynukleotide bereitzustellen, die gegenüber einem Angriff von Nukleasen beständig sind und die mit verbesserter Spezifität an einen komplementären Nukleotidstrang binden.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß sich dieses Ziel dadurch erreichen läßt, daß man die 2'-Position mit einer Alkyloxygruppe mit mindestens 2 Kohlenstoffatomen substituiert.

Die Erfindung betrifft daher Nukleopolymere auf der Basis von 2'-O-Alkylnukleotiden der allgemeinen Formel II



worin

B ein beliebiger, dem Fachmann bekannter Abkömmling irgend-einer Nukleosidbase und insbesondere eine Adenyl-9-yl- (A), eine Cytosin-1-yl- (C), eine Guanin-9-yl- (G), eine Uracil-1-yl- (U), eine Hypoxanthin-9-yl- (I) oder eine Thymin-1-yl-Gruppe (T) darstellt. Von den Adeninderivaten ist der 2-Ami-noadenin-9-yl-Rest bevorzugt. Zweckmäßigerverweise tragen ein oder mehrere der Nukleosidbasen einen Substituenten L, die die Anlagerung an bestimmte Zellteile oder Enzyme oder auch an geeignetes Chromatographiematerial erleichtert. Solche Affinitäts-Substituenten sind dem Fachmann bekannt.

A ein O-Atom oder eine CH₂-Gruppe bedeutet,
X oder Z ein O-Atom, ein S-Atom, eine NH- oder CH₂-Gruppe darstellen und sowohl gleich als auch verschieden sein können,

V und W für ein O-, S-, Se-Atom stehen, bzw. eine -OH-, -SH-, -NH₂-, Alkyl- oder Alkyloxygruppe bedeuten.

Bevorzugte Alkyl- und Alkyloxygruppen weisen 1 bis 4 Kohlen-stoffatome auf und sind insbesondere -CH₃, C₂H₅ und/oder OCH₃ bzw. OC₂H₅. In einer Monomereinheit in den erfindungsgemäßigen Oligo- bzw. Polynukleotiden können V und W sowohl gleich als auch verschieden sein.

L steht für ein H-Atom oder einen Partner eines Bindepaares.

C bedeutet eine Gruppe der allgemeinen Formel -O-R, worin R eine gegebenenfalls modifizierte Alkylgruppe mit mindestens 1 C-Atom, oder eine gegebenenfalls modifizierte Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit mindestens 2 C-Atomen bedeutet, wobei die Modifikation in einer Substitution durch einen oder mehrere Halogen-, Cyano-, Carboxy-, Hydroxy-, Nitro- oder/und Mercap-to-Reste besteht. Vorzugsweise weist die Alkylgruppe 3 bis 6 und im besonderen 3 oder 4 Kohlenstoffatome auf. Beispiele für besonders geeignete Alkylgruppen sind Propyl, Butyl, jedoch sind auch modifizierte Alkylgruppen, wie Cyanomethyl, bevorzugt. Besonders bevorzugt sind Alkenylketten und im

besonderen Alk-2-enylreste, wovon wiederum ein Allylrest bevorzugt ist. Beispielhaft für Alkinylgruppen kann der Propargylrest genannt werden.

Bevorzugte erfindungsgemäße Polymere weisen ein oder mehrere der zuvor geschilderten monomeren Einheiten auf, gegebenenfalls in Kombination mit anderen monomeren Einheiten, in denen -O-R gleich -O-Allyl, A gleich O, X gleich O, Z gleich O, W gleich O und V gleich OH ist und das C1-Kohlenstoffatom des Zuckers die β -Konfiguration aufweist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Oligo- und Polynukleotide an ihrem 3'-Ende ein 3'-Deoxyribonukleosid auf, wodurch der Angriff von 3'-Exonukleasen inhibiert und ein Abbau durch diese Enzyme zusätzlich erschwert wird.

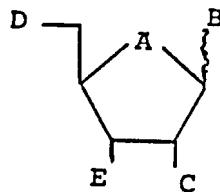
Durch den Einbau eines Partners eines Bindepaares, z.B. aus den Paaren Antikörper/Antigen oder Biotin/Avidin bzw. Streptavidin, vorzugsweise von Biotin oder einem Dinitrophenylrest in das erfindungsgemäße Polymer ist es möglich, das erfindungsgemäße Nukleotidpolymer zu immobilisieren und eine Affinitäts-Chromatographie von Proteinen, Nukleinsäuren und/oder Protein/Nukleinsäure-Komplexen durchzuführen, die an das immobilisierte Nukleotidpolymer binden.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Hybridisierung mit Nukleinsäuren aus, die eine dazu entsprechend komplementäre Zielsequenz aufweisen und sind besonders inert gegen den Abbau mittels Nukleasen, weshalb sie in lebenden Zellen eine hohe biologische Halbwertszeit aufweisen. Darüberhinaus weisen sie gegenüber dem Stand der Technik eine verringerte, nicht spezifische Bindung mit Nukleinsäure-Bindungsproteinen auf.

Die Erfindung betrifft jedoch auch Nukleotid-Monomere, die zur Synthese der erfindungsgemäßen Oligo- bzw. Polynukleotide

geeignet sind und die in der 2'-Position des Zuckerteils einen gegebenenfalls durch einen oder mehrere Halogen-, Cyano-, Carboxy-, Hydroxy-, Nitro- oder/und Mercapto-Reste modifizierten Alkyloxy-, Alkenyloxy- oder Alkinyloxyrest mit mindestens 1 Kohlenstoffatomen aufweisen.

Besonders bevorzugte Reste sind O-Alk-2-enyl-Reste und im besonderen O-Allylreste. Üblicherweise weist ein solches Monomer die allgemeine Formel I



auf, worin A, B und C die zuvor definierte Bedeutung aufweisen und D und E zur Ausbildung von 3'-5'-Internukleotid-Bindungen fähige reaktive Gruppen oder die $-PO_4 H_2^-$, $-P_2O_7 H_3^-$ oder $-P_3O_{10} H_4^-$ -Gruppe bedeuten. Solche Gruppen sind dem Fachmann bekannt und z.B. in B. Sproat et al., Nucleic Acids Research 18 (1990), 41-49 sowie zusammenfassend in E.L. Winnacker, Gene und Klone, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Deutschland) (1985), insbesondere Seiten 44 bis 49 und in Froehler/Matteucci, Tetrahedron Lett. (1986), p. 469-472, beschrieben. Besonders bevorzugt als reaktive Gruppe ist die OH-Gruppe. Ebenso bevorzugt als D und/oder E sind die $PO_4 H_2^-$, $-P_2O_7 H_3^-$ und die $-P_3O_{10} H_4^-$ -Gruppe. Diese Mono-, Di- oder Triphosphate bzw. Salze der Verbindungen der allgemeinen Formel I können bevorzugt als 5'-Triphosphate, beispielsweise enzymatisch mit DNA/RNA-Polymerasen in wachsende Nucleinsäureketten eingebaut werden (vgl. z.B. Random priming, Anal. Biochem. 132 (1983) 6-13, Nick translation, J.Mol.Biol. 113 (1977) 237-251). Mit den erfindungsgemäßen reaktiven Mononukleotiden lassen sich auf an sich bekannte Weise, insbesondere an einer festen Phase die ebenfalls erfindungsgemäßen Oligo- und Poly-

nukleotide herstellen. Die Herstellung solcher Polynukleotide aus den entsprechenden Mononukleotiden ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise ebenfalls in den zuvor genannten Literaturstellen näher beschrieben. Die Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Herstellung von Oligo- und Polynukleotiden unter der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleotidmonomere.

Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäß erhaltenen Oligo- und Polynukleotide als Anti-Sense-Proben und als Arzneimittel, insbesondere als Arzneimittel zur Behandlung von mit Viren befallenen Zellen wie z.B. dem Herpes, Influenza- oder dem AIDS-Erreger sowie zur Steuerung der Genexpression.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

B e i s p i e l 1

Nach dem in B. Sproat, B. Beijer und A. Iribarren in Nucleic Acids Research, Vol. 18 (1990), 41-49 beschriebenen Verfahren wurden nach der Phosphoamidit-Methode 2'-O-Allyl-oligoribonukleotide sowie 2'-O-Methyl-oligoribonukleotide mit jeweils identischer Sequenz hergestellt. Anschließend wurden, wie in A. Lamond et al. in Cell, Vol. 58 (1989), 383-390 beschriebenen Verfahren die beiden an ihrem 5'-Ende mit ^{32}P -Phosphat markierten Proben mit einem Kernextrakt inkubiert, der von Hela-Zellen gewonnen wurde. Beide Proben wurden dann einer Gelchromatographie unterzogen. Es zeigt sich, daß die erfindungsgemäßen 2'-O-Allyl-Oligonukleotide eine außergewöhnlich hohe spezifische und im Vergleich zu den zum Stand der Technik gehörenden 2'-O-Me-Oligonukleotide eine vernachlässigbare, nichtspezifische Bindungsaktivität.

Die Nukleotidsequenz war

5'-AIAACAIAUACUACACUUUA

Sie bindet an Human U2 RNA.

B e i s p i e l 2

Die gemäß Beispiel 1 hergestellten 2'-O-Allyl-Oligoribonukleotide wurden verschiedenen Nukleasen versetzt und ihrer Empfindlichkeit gegenüber enzymatischem Abbau bestimmt. Im Vergleich zu normaler, nicht modifizierter RNA mit einer identischen Sequenz zeigt sich, daß bei Verdauung mit pankreatischer RNase A, RNase CL-3, RNase T1, RNase T2 und RNase U2 die erfindungsgemäßen 2'-O-Allyl-Oligonukleotide gegenüber einem enzymatischen Angriff von Nukleasen völlig stabil sind, wohingegen natürliche RNA in allen Fällen vollständig abgebaut wird.

B e i s p i e l 3

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2-chlor-6-(2,6-dichlorphenoxy)purinribosid (A) wurde wie in Sproat, B.S., Beijer, B. und Iribarren, A., Nucleic Acids Research, 1990, 18, 41-49 beschrieben, synthetisiert. Die so erhaltene Verbindung A wurde dann wie nachstehend beschrieben allyliert.

Synthese von 3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-allyl-2-chlor-6-(2,6-dichlorphenoxy)purinribosid (B):

Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium (0) (174 mg, 0,19 mmol) und 1,4-bis (Diphenylphosphin)butan (324 mg, 0,76 mmol) wurden in trockenem Tetrahydrofuran (50 ml) suspendiert. Eine Lösung von Verbindung A (13,11 g, 19 mmol) und Allylethylcarbonat (4,95 g, 38 mmol) in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran wurde zugesetzt und die Mischung 30 Minuten zum Rückfluß

erhitzt. Silica-Gel t.l.c. in Petroläther/Ethylacetat (2:1 v/v) zeigte eine vollständige Reaktion mit einem einzigen UV-positiven Fleck von R_f 0,54 (Verbindung A hat R_f 0,41). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen unter Zurücklassung eines roten Sirups, der in Petroläther/Ethylacetat (9:2 v/v) gelöst und die Lösung filtriert wurde, um unlöslichen Pd-Phosphinkomplex zu entfernen. Das Produkt wurde durch präparative Flüssigkeitschromatographie auf Silica-Gel gereinigt unter Elution mit Petroläther/Ethylacetat (9:2 v/v). Die reine Verbindung B wurde so erhalten in Form eines hellgelben Schaums (12,4 g, 89,4 %). ^{13}C NMR Spektrum (CDCl_3) δ : 158,12 (C6), 153,13 und 152,54 (C-2 und C-4), 144,66 (Phenyl C-1), 142,43 (C-8), 133,75 (-CH = von Allyl), 128,77 (Phenyl C-2 und C-6), 128,52 (Phenyl C-3 und C-5), 127,12 (Phenyl C-4), 120,51 (C-5), 117,0 (= CH_2 von Allyl), 88,26 (C-1'), 81,16 (C-4'), 80,6 (C-2'), 71,4 (O- CH_2 - von Allyl), 69,54 (C-3'), 59,61 (C-5'), 17,19-16,63 (Isopropyl CH_3 s), 13,16, 12,70 und 12,29 p.p.m. (Isopropyl CHs).

Die Verbindung B wurde weiter über verschiedene Stufen in das entsprechende Nukleotidmonomer, nämlich 5'-O-Dimethoxytrityl-N²-dimethylaminomethyliden-2'-O-allylguanosin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit) unter Verwendung der in Nucleic Acids Research, 1990, 18, 41-49 beschriebenen Methode umgewandelt.

Monomere wurden in Polymere überführt wie beschrieben in Nucleic Acids Research, 1989, 17, 3373-3386.

B e i s p i e l 4

Synthese von 3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-propargyl-4-O-(2,6-dichlorphenyl)uridin (C):

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-4-O-(2,6-dichlorphenyl)uridin (18,95 g, 30 mmol) wurden durch Verdampfen von Acetonitril im Vakuum getrocknet. Der verbleibende Schaum wurde in wasserfreiem Acetonitril (50 ml) aufgelöst, eine 80 %ige Lösung bezogen auf das Gewicht von Propargylbromid in Toluol (3,56 ml, 33 mmol) gefolgt von 2-Tert.-butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazaphosphorin (9,55 ml, 33 mmol) wurden unter Röhren und Ausschluß von Feuchtigkeit zugegeben. Silicagel t.l.c. in Hexan/Ethylacetat (2:1 v/v) zeigte komplett Reaktion nach 5 Stunden mit einem UV-absorbierenden Produktpunkt von R_f 0,38. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt unter Zurücklassung eines cremefarbenen Schaums. Das Produkt wurde durch präparative Flüssigchromatographie unter Verwendung von Petrolether/Dichlormethan/Ethylacetat (8:2:1, bezogen auf das Volumen) als Eluant gereinigt. Das reine Produkt C wurde erhalten als ein weißer Schaum (10,7 g, 53,3 %). ^{13}C NMR-Spektrum (CDCl_3) δ : 169,80 (C-4), 154,60 (C-2), 144,76 (Phenyl C-1), 144,41 (C-6), 128,69 (Phenyl C-2 und C-6), 128,65 (Phenyl C-3 und C-5), 127,08 (Phenyl C-4), 93,80 (C-5), 89,80 (C-1'), 81,70 (C-2'), 80,34 (C-4'), 79,54 (-C≡ von Propargyl), 74,63 (=CH von Propargyl), 67,63 (C-3'), 59,37 (C-5'), 58,01 (OCH₂ von Propargyl), 17,36, 17,21, 16,90 und 16,73 (Isopropyl CH_{3s}), 13,36, 12,92, 12,84 und 12,28 p.p.m. (Isopropyl CH_s).

Die Verbindung C konnte über verschiedene Schritte in Cytidin und Uridin-Monomere zur Festphasenpolymer-Herstellung überführt werden.

B e i s p i e l 5

Synthese von 3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-cyanomethyl-4-O-(2,6-dichlorphenyl)uridin (D):

Die Alkylierung wurde analog Beispiel 4 durchgeführt unter Verwendung von Bromacetonitril anstelle von Propargylbromid. Die Titelverbindung wurde erhalten als ein weißer Schaum in 55 %iger Ausbeute, R_f 0,51 auf Silicagel t.l.c. in Petrol-ether/Ethylacetat (1:1 v/v). ^{13}C NMR-Spektrum (CDCl_3) δ : 169,91 (C-4), 154,57 (C-2), 144,54 (Phenyl C-1), 143,96 (C-6), 128,69 (Phenyl C-2 und C-6), 128,60 (Phenyl C-3 und C-5), 127,12 (Phenyl C-4), 115,72 (CN von Cyanomethyl), 94,10 (C-5), 89,17 (C-1'), 82,34 (C-2'), 81,60 (C-4'), 67,27 (C-3'), 59,06 (C-5'), 55,82 (CH_2 von Cyanomethyl), 17,20, 17,08, 16,80 und 16,61 (Isopropyl CH_3 s), 13,23, 12,70 und 12,24 p.p.m. (Isopropyl CH_3 s).

B e i s p i e l 6

2'-O-Propylierung wird am besten bewirkt durch 2'-O-Allylierung gefolgt von Reduktion der Allylgruppe. 2'-O-Butylierung wird am besten durchgeführt durch 2'-O-Crotylierung (unter Verwendung von Crotylbromid und dem Verfahren, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist), gefolgt von Reduktion der Crotylgruppe.

B e i s p i e l 7

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-4-O-(2,6-dichlorphenyl)-uridin

14,65 g (60 mmol) getrocknetes Uridin werden in 150 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und die Lösung im Eisbad gekühlt. Dazu wird eine Lösung von 21 g (67 mmol) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan in 10 ml Dichlormethan während 15 Minuten unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß zugefügt. Nach beendeter Zugabe wird die Mischung 3 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt; im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel; Fließmittel Chloroform/Ethanol 9:1) beobachtet man danach vollständige Umsetzung zu einem Produkt mit R_f 0,58. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 ml Methanol gestoppt und die Mischung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 200 ml Dichlormethan aufgenommen und 2x mit je 200 ml 1 mol/l Natriumbicarbonat-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird 2x mit je 25 ml Toluol im Vakuum coevaporiert wonach ein weißer schaumiger Rückstand resultiert. Dieser wird in 200 ml wasserfreiem 1,2-Dichlorethan gelöst und mit 42 ml Triethylamin (300 mmol), sowie 22,5 ml Chlortrimethylsilan (180 mmol) unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß versetzt. Nach 30 Minuten Reaktionszeit zeigt ein Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel; Petrolether/Ethylacetat 2:1) vollständige Umsetzung mit einem Fleck vom R_f 0,39. Die Reaktionsmischung wird unter kräftigem Rühren in 500 ml 1 mol/l Natriumbicarbonat-Lösung gegossen, die organische Phase abgetrennt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand noch 2x mit je 25 ml trockenem Toluol coevaporiert. Das so erhaltene 2'-O-Trimethylsilyl-Derivat wird in 300 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit 42 ml Triethylamin (300 mmol), 19,5 g 2-Mesitylensulphonylchlorid (90 mmol) und 1,8 g 4-Dimethylaminopyridin (15 mmol) unter Rühren und Feuchtig-

keitsausschluß versetzt. Im DC (Kieselgel; Petrolether/Ethylacetat 2:1) beobachtet man nach 30 minütiger Reaktionszeit vollständige Umsetzung zu einem Produkt mit R_f 0,63. Zur Reaktionslösung gibt man 1,35 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (12 mmol) und 19,6 g 2,6-Dichlorphenol (120 mmol) und röhrt 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit ist die Umsetzung vollständig, wie ein DC in Petrolether/Ethylacetat 2:1 auf Kieselgel zeigt (R_f 0,56). Die Reaktionsmischung wird in 500 ml 1 mol/l Na-bicarbonat-Lösung eingerührt die organische Phase abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der 2'-O-Trimethylsilylether wird als öliger, viskoser Rückstand erhalten. Der Sirup wird in 300 ml Dichlormethan gelöst und dazu unter Rühren eine Lösung von 28,5 g p-Toluolsulfonsäure-monohydrat (150 mmol) in 100ml Tetrahydrofuran gegeben. Nach 2,5 Minuten werden 28 ml Triethylamin zur Neutralisation der Säure zugefügt. Danach wird die Reaktionslösung unter starkem Rühren in 500 ml 1 mol/l Na-bicarbonat-Lösung eingegossen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das DC (Kieselgel; Petrolether/Ethylacetat 1:1) zeigt einen Fleck mit R_f 0,59 von 2,6-Dichlorphenyl-2-mesitylsulfonat und einen weiteren mit R_f 0,41 des gewünschten Produktes. Das rohe Produkt wird in mehreren Portionen durch präparative Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat(2:1) als Eluens gereinigt. Nach Eindampfen der Fraktionen erhält man 25,6 g, entsprechend 67,5 % der Theorie an reinem Endprodukt.

R_f -Wert (Kieselgel; Petrolether/Ethylacetat 2:1) 0,23

^{13}C NMR-Spektrum (CDCl_3) δ : 169,82 (C-4), 154,70 (C-2), 144,94 (C-6), 144,77 (Phenyl-C-1), 128,92 (Phenyl-C-2 and C-6), 128,71 (Phenyl C-3 und C-5), 127,11 (Phenyl C-4), 94,05 (C-5), 92,22 (C-1'), 82,01 (C-4'), 74,88 (C-2'), 68,89 (C-3'), 60,35 (C-5'), 17,40 - 16,85 (Isopropyl- CH_3 's), 13,34, 12,91, 12,83 und 12,48 ppm (Isopropyl- CH' s).

B e i s p i e l 8

3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-allyl-4-O-(2,6-dichlorphenyl)uridin

Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) (0,183 g, 0,2 mmol) und 1,4-Bis(diphenylphosphino)butan (0,341 g, 0,8 mmol) werden in trockenem Tetrahydrofuran (40 ml) unter Argonatmosphäre suspendiert. Eine Lösung der nach Beispiel 7 hergestellten Verbindung (12,63 g, 20 mmol) und Allylethylcarbonat (5,2 g, 40 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (60 ml) wird zugegeben und die Mischung für 30 min unter Rückfluß erhitzt. Der vollständige Reaktionsablauf wird durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Laufmittel Petrolether/Ethylacetat, 2:1, vol.) überprüft. Das Reaktionsprodukt wird durch eine neue Bande mit einem Rf-Wert von 0,48 angezeigt. Nach Abkühlen wird die Mischung filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Reaktionsprodukt wird durch präparative Chromatographie an Kieselgel mit 3 % Ethylacetat in Dichlormethan als Laufmittel gereinigt.

Nach Eindampfen der Fraktionen erhält man 11 g (81,9 % der Theorie) Endprodukt.

R_f-Wert (Kieselgel-Dünnschichtchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 2:1): 0,51

¹³C NMR-Spektrum (CDCl₃) δ: 169,61 (C-4), 154,49 (C-2), 144,64 (Phenyl C-1), 144,37 (C-6), 134,29 (Allyl CH), 128,75 (Phenyl C-2 und C-6), 128,51 (Phenyl C-3 und C-5), 126,93 (Phenyl C-4), 116,85 (Allyl = CH₂), 93,50 (C- 5), 89,94 (C-1'), 81,64 (C-2'), 80,40 (C-4'), 70,90 (O-CH₂ von Allyl), 67,49 (C-3'), 59,34 (C-5'), 17,24, 17,10, 16,79 und 16,63 (Isopropyl CH₃s), 13,21, 12,83, 12,70 und 12,30 p.p.m. (Isopropyl CHs).

B e i s p i e l 9

2'-O-Allyl-4-O-(2,6-dichlorphenyl)uridin

5,5 g (8,19 mmol), der nach Beispiel 8 hergestellten Verbindung, werden in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und 1,1 Mol/l Tetrabutylammoniumfluorid in 18 ml Tetrahydrofuran unter Rühren zugegeben. Nach 5 min ist die Reaktion vollständig wie ein Dünnschichtchromatogramm mit Ethanol/Chloroform (5 : 95 vol.) als Laufmittel auf Kieselgel zeigt (R_f : 0,22).

Die Reaktion wird mit Pyridin/Methanol/Wasser (50 ml, 3 : 1 : 1 vol.) gestoppt und die Lösung unter Rühren auf die Pyridinform von Dowex 50 Wx4-200 Harz (30 g suspendiert in Pyridin/Methanol/Wasser 50 ml 3: 1 : 1 vol) gegeben. Die Mischung wird 20 min gerührt, das Harz abfiltriert und mit dem o. g. Lösungsmittel (3 x 50 ml) gewaschen. Die vereinigten Filtrate und Waschlösungen werden bis zum Trocknen im Vakuum eingedampft, in Toluol aufgenommen und nochmals eingedampft. Das Rohprodukt wird in 3 Portionen durch präparative Chromatographie auf Kieselgel mit 6 % Ethanol in Chloroform als Elutionsmittel gereinigt. Nach Eindampfen der Fraktionen im Vakuum werden Reste von Ethanol und Pyridin durch Zugabe von Toluol und nochmaliges Eindampfen im Vakuum bei 45°C entfernt. Nach Eindampfen erhält man 2,91 g (82,9 % der Theorie) an reinem Endprodukt.

R_f -Wert (Kieselgel; Ethanol/Chloroform 1 : 4): 0,57

^{13}C NMR Spektrum (CDCl_3) δ : 169,74 (C-4); 155,28 (C-2), 146,20 (C-6), 144,42 (phenyl C-1), 133,54 (allyl CH), 128,67 (phenyl C-2 und C-6), 128,57 (phenyl C-3 und C-5), 127,13 (phenyl C-4), 117,98 (allyl = CH_2), 94,41 (C-5), 89,60 (C-1'), 84,54 (C-4'), 81,01 (C-2'), 71,10 (allyl CH_2O), 67,43 (C-3') and 59,55 p.p.m. (C-5').

B e i s p i e l 10

2'-O-Allyl-uridin

2,91 g (6,79 mmol) der nach Beispiel 9 hergestellten Verbindung werden in 20 ml trockenem Acetonitril gelöst. Es werden 2,82 g (16,98 mmol) 2-Nitrobenzaldoxim und 1,76 g (15,28 mmol) 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in 20 ml trockenem Acetonitril zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Ein Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Ethanol/Chloroform (1 : 4 vol) als Laufmittel zeigt, daß die Reaktion vollständig abgelaufen ist (R_f 0,37). Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft und der verbleibende Rest in 100 ml Dichlormethan gelöst und das Produkt mit 100 ml Wasser extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit 100 ml Dichlormethan und anschließend mit 100 ml Diethylether gewaschen. Die gelbliche wäßrige Phase wird anschließend mit der Pyridinform von Dowex 50 Wx4-200 Harz (25 g) 5 min gerührt. Das Harz wird abfiltriert und das trübe Filtrat mit 2 x 50 ml Dichlormethan und anschließend 100 ml Ether gewaschen. Die wäßrige Phase wird im Vakuum eingedampft. Wasserspuren werden durch Zugabe von Methanol und Tetrahydrofuran und anschließendes Eindampfen beseitigt. Die gewünschte Verbindung wird aus Methanol kristallisiert, abfiltriert und mit Ether gewaschen und getrocknet. Man erhält 1,83 g (94 % der Theorie) von 2'-O-Allyluridin.

R_f -Wert (Kieselgel; Ethanol/Chloroform 1 : 4 vol): 0,39.

^{13}C N.M.R. spektrum (pyridin - d₅) δ : 164,48 (C-4), 151,72 (C-2), 140,76 (C-6), 135,11 (CH von Allyl), 116,96 (allyl = CH₂), 102,17 (C-5), 88,26 (C-1'), 85,72 (C-4'), 82,57 (C-2'), 71,38 (allyl CH₂O), 69,41 (C-3') and 60,75 p.p.m. (C-5').

B e i s p i e l 11

2'-O-Allyl-uridin-5'-monophosphat

1,42 g 2'-O-Allyl-uridin (5,0 mmol) wurden nach der Methode von Yoshikawa et al. (1967) Tetrahedron Lett. 50, 5065 phosphoryliert. Die Ausbeute nach chromatographischer Aufreinigung betrug 980 mg.

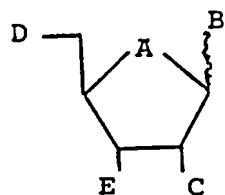
Beispiel 122'-O-Allyl-uridin-5'-diphosphat und -5'-triphosphat

Zur Herstellung der Di- bzw. Triphosphate wurden jeweils 365 mg (1 mmol) des Monophosphates nach der Methode von Hoard und Ott (1965) J. Am. Chem. Soc. 87, 1785 mit Orthophosphorsäure bzw. Pyrophosphorsäure umgesetzt. Die Ausbeuten betrugen 220 mg an Diphosphat bzw. 140 mg an Triphosphat.

Alle 5'-Phosphate wurden mittels Elementaranalyse, Elektrophorese und ^{31}P -NMR-Spektroskopie charakterisiert.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Nukleotid-Analogon der allgemeinen Formel I,



worin

B eine beliebige Nukleobase,

A ein O-Atom oder CH₂;

C gleich -O-R ist und R eine gegebenenfalls modifizierte Alkylgruppe mit mindestens 1 C-Atom, oder eine gegebenenfalls modifizierte Alkenyl- oder Alkinyl-gruppe mit mindestens 2 C-Atomen bedeutet, wobei die Modifikation in einer Substitution durch einen oder mehrere Halogen-, Cyano-, Carboxy-, Hydroxy-, Nitro- oder/und Mercapto-Reste besteht, und

D und E an sich bekannte, zur Ausbildung von 3'-5'-Internukleotid-Bindungen fähige reaktive Gruppen oder die -PO₄H₂- , -P₂O₇H₃- oder -P₃O₁₀H₄-Gruppe bedeuten.

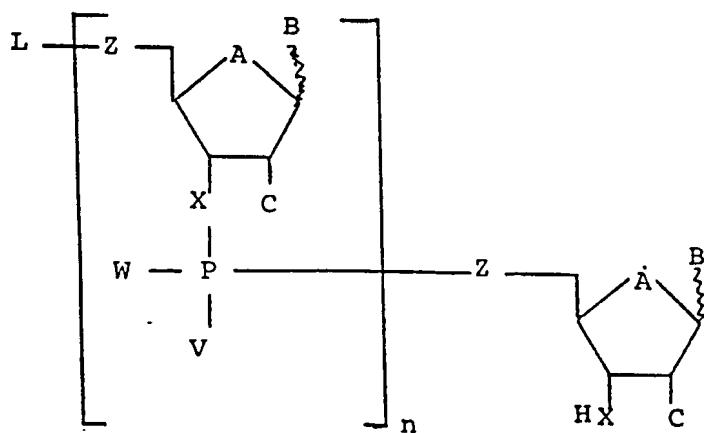
2. Nukleotid nach Anspruch 1,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß es als Nukleobase einen Adenin-9-yl-, Cytosin-1-yl-, Guanin-9-yl-, Uracil-1-yl, Hypoxanthin-9-yl-, oder Thymine-1-yl-Rest aufweist.

3. Nukleotid nach Anspruch 1 oder 2,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Nukleobase ein 2-Aminoadenin-9-yl-Rest ist.

4. Nukleotid nach Anspruch 1 oder 2,
durch gekennzeichnet,
daß der Alkenylrest ein Alk-2-enylrest ist.
5. Nukleotid nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
durch gekennzeichnet,
daß der Alkenylrest ein Allylrest ist.
6. Verfahren zur Herstellung von Poly- und Oligonukleotiden, insbesondere an einer festen Phase,
durch gekennzeichnet,
daß man mindestens ein Nukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 auf an sich bekannte Weise mit anderen Nukleotiden umsetzt.
7. Nukleotid-Polymer, erhältlich durch Umsetzung von reaktiven Mononukleotiden auf an sich bekannte Weise, insbesondere an einer festen Phase,
durch gekennzeichnet,
daß es mindestens ein Monomeres nach den Ansprüchen 1 bis 5 enthält.
8. Nukleotid-Polymeres nach Anspruch 7 mit der Formel II



wobei

X oder Z gleich O, S, NH oder CH₂ bedeutet, wobei X und Z in einer monomeren Einheit gleich oder verschieden sein kann,

V und W ein O, S, Se, NH₂, ein Alkyl- oder ein Alkyloxyrest, OH oder SH bedeutet, wobei V und W in einer Monomereinheit gleich oder verschieden sein können und L ein H-Atom oder ein Partner eines Bindepaares ist und wobei B, A und C die in Anspruch 1 definierte Bedeutung aufweisen und

n eine beliebige ganze Zahl bedeutet.

9. Nukleotid-Polymeres nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß L einen Biotinrest bedeutet.
10. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es an seinem 3'-terminalen Ende ein 3'-Deoxyribonukleosid aufweist.
11. Verwendung von Nukleotidpolymeren nach einem der vorhergehenden Ansprüche als Antisense-Proben zur Hemmung der Genexpression und als Arzneimittel.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/00665

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl⁵: C 07 H 19/04, A 61 K 31/70, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl ⁵	C 07 H 19/00, A 61 K 31/00, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁹

Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	WO, A, 89/12642 (COMPAGNIE ORIS INDUSTRIE S.A.) 28 December 1989 see the whole document ---	1-3,6-11
X	EP, A, 0260032 (AJINOMOTO CO., INC.) 16 March 1988 see abstract; page 2, line 1 - page 3, line 40	1-3,6-8,10, 11
Y	---	1-3,6-11
X	Nucleic Acids Research, vol. 17, No. 9, 11 May 1989, IRL Press Ltd., (Oxford, GB), B.S. Sproat et al. : "Highly efficient chemical synthesis of 2'-O- methyloligonucleotides and tetra- biotinylated derivatives; novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases", pages 3373-3386 see the whole document ---	1-3,6-11
		./..

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
28 June 1991 (28.06.91)	20 August 1991 (20.08.91)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
European Patent Office	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	Nucleic Acids Research, vol. 15, No. 15, 11 August 1987, IRL Press Ltd., (Oxford, GB), H. Inoue et al. : "Synthesis and hybridization studies on two complementary nona (2'-O- methyl) ribonucleotides", pages 6131-6148 see the whole document ---	1-3,6-11
X	Chemical Abstracts, vol. 114, No. 17, 29 April 1991, (Columbus, OH, US), see page 830, abstract 164721j, & JP, A, 02264792 (AJINOMOTO CO. INC) 29 October 1990 see abstract -----	1-3,6-11

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9100665
SA 46317

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 14/08/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8912642	28-12-89	FR-A-	2632955	22-12-89
		AU-A-	3866089	12-01-90
		EP-A-	0422090	17-04-91
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A- 0260032	16-03-88	AU-A-	1677688	01-12-88
		US-A-	5013830	07-05-91
		JP-A-	63183599	28-07-88
-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/00665

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl ⁵ C 07 H 19/04, A 61 K 31/70, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. ⁵	C 07 H 19/00, A 61 K 31/00, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/00	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
Y	WO, A, 89/12642 (COMPAGNIE ORIS INDUSTRIE S.A.) 28. Dezember 1989 siehe das ganze Dokument ---	1-3,6-11
X	EP, A, 0260032 (AJINOMOTO CO., INC.) 16. März 1988 siehe Zusammenfassung; Seite 2, Zeile 1 - Seite 3, Zeile 40 ---	1-3,6-8,10,11
Y		1-3,6-11
X	Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 9, 11. Mai 1989, IRL Press Ltd., (Oxford, GB), B.S. Sproat et al.: "Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligonucleotides and tetra-biotinylated derivatives; novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases", Seiten 3373-3386 siehe das ganze Dokument ----	1-3,6-11
		. / .
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
28. Juni 1991	28 AUG 1991	
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des beauftragten Beamten ... T. TAZELAAR	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Nucleic Acids Research, Band 15, Nr. 15, 11. August 1987, IRL Press Ltd., (Oxford, GB), H. Inoue et al.: "Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl) ribonucleotides", Seiten 6131-6148 siehe das ganze Dokument ---	1-3,6-11
X	Chemical Abstracts, Band 114, Nr. 17, 29. April 1991, (Columbus, OH, US), siehe Seite 830, Zusammenfassung 164721j, & JP, A, 02264792 (AJINOMOTO CO. INC) 29. Oktober 1990 siehe Zusammenfassung	1-3,6-11

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9100665
SA 46317

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 14/08/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A- 8912642	28-12-89	FR-A-	2632955	22-12-89
		AU-A-	3866089	12-01-90
		EP-A-	0422090	17-04-91
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A- 0260032	16-03-88	AU-A-	1677688	01-12-88
		US-A-	5013830	07-05-91
		JP-A-	63183599	28-07-88
-----	-----	-----	-----	-----